

**Katarzyna Kruczak, Ewa Niżankowska-Mogilnicka**

Klinika Pulmonologii, II Katedra Chorób Wewnętrznych Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie  
Kierownik Kliniki: prof. dr hab. med. Ewa Niżankowska-Mogilnicka

## Nowe możliwości diagnostyki utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy

The new diagnostic methods of latent tuberculosis infection

### Abstract

So far the only method of diagnostic assessment of tubercle bacillus infection was a skin tuberculin reaction — but it has low specificity and sensitivity. The article discusses the new tests in the diagnosis of a latent phase of tuberculosis infection and the active form of the disease based on the measurement of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) released by lymphocyte T after the stimulation by antigens which are specific for *M. tuberculosis*: ESAT-6, CFP-10. The sensitivity and specificity of QuantiFERON-TB Gold and T-SPOT.TB tests in diagnosis of infection as well as in active form of disease, comparison between the results of tuberculin skin test and the results obtained by the new tests, and problem of incompatibility of results obtained thanks to those tests are discussed.

**Key words:** latent tuberculosis infection, tuberculin skin test, IGRA tests

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 446–450**

### Streszczenie

Dotychczas jednym z ważnych narzędzi diagnostycznych zakażenia prątkiem gruźlicy był skórny odczyn tuberkulinowy — jest on jednak mało swoisty i mało czuły. W niniejszym artykule omówiono nowe testy w diagnostyce utajonej infekcji gruźliczej oraz czynnej postaci choroby. Zasada ich działania opiera się na pomiarze interferonu gamma (IFN- $\gamma$ ) wydzielanego przez limfocyty T po stymulacji przez antygeny swoiste dla prątka gruźlicy: ESAT-6, CFP-10. Omówiono czułość i swoistość testów QuantiFERON-TB Gold oraz T-SPOT.TB zarówno w zakażeniu, jak i w czynnej postaci choroby, porównanie ich z tuberkulinowym testem skórnym oraz problem niezgodności wyników otrzymanych za pomocą tych testów.

**Słowa kluczowe:** utajone zakażenie prątkiem gruźlicy, test tuberkulinowy, testy IGRA

**Pneumonol. Alergol. Pol. 2008; 76: 446–450**

### Wstęp

Co roku notuje się na świecie około 8 mln nowych zachorowań na gruźlicę i około 1,8 mln zgonów. Gruźlica jest drugą pod względem częstości przyczyną zgonów z powodu chorób zakaźnych na całym świecie, tuż po zakażeniu HIV; jest również najczęstszą przyczyną zgonów wśród chorych na AIDS [1].

Częstość występowania gruźlicy wzrasta gwałtownie w większości krajów afrykańskich leżących

na południe od Sahary, w Indiach i krajach byłego Związku Radzieckiego. W Rosji w latach 1990–2000 nastąpił alarmujący wzrost liczby nowych zachorowań; zanotowano także gwałtowne zwiększenie się przypadków gruźlicy lekoopornej i wielolekoopornej [2].

Szybka diagnostyka i leczenie chorych na gruźlicę jest podstawowym czynnikiem gwarantującym opanowanie tej choroby. Jednakże w krajach o niskim i średnim współczynniku zapadalności

**Adres do korespondencji:** Katarzyna Kruczak, Klinika Pulmonologii, II Katedra Chorób Wewnętrznych CM UJ, ul. Skawińska 8, 31–066 Kraków

Praca wpłynęła do Redakcji: 31.03.2008 r.

Copyright © 2008 Via Medica

ISSN 0867–7077

leczenie tzw. utajonej infekcji gruźliczej (LTBI, *latent tuberculosis infection*), czyli zakażenia prątkiem gruźlicy, służące zahamowaniu progresji zakażenia w czynną postać choroby, jest również istotne. Leczenie utajonej infekcji gruźliczej obniża ryzyko przejścia w aktywną postać choroby o około 90% [3, 4].

Czynniki ryzyka przejścia zakażenia w czynną chorobę jest świeża infekcja prątkiem gruźlicy, a także wiele czynników zależnych od gospodarza, takich jak: młody wiek (zwłaszcza dzieci < 5. roku życia), zakażenie HIV, choroby przewlekłe, takie jak: niewydolność nerek, cukrzyca, leczenie immunosupresyjne, przeszczepienie narządu, układowa kortykosteroidoterapia [5].

### **Tuberkulinowy test skórny w diagnostyce zakażenia prątkiem gruźlicy**

Klasyczną i dotąd jedyną metodą diagnostyki zakażenia prątkiem gruźlicy był tzw. test tuberkulinowy (TST, *tuberkulin skin test*), znany również jako test Mantoux.

Zasada wykonywania testu tuberkulinowego polega na śródskórnym wstrzyknięciu w środkową część przedramienia „preparatu tuberkulinowego” (PPD, *purified protein derivative*) i pomiarze średnicy nacieku po 72 godzinach od podaniu 2 jego jednostek. Indukuje to tzw. opóźniony typ nadwrażliwości komórkowej (DTH, *delayed type of hypersensitivity*), w której uczestniczą limfocyty T i makrofagi. W związku z tym test ten jest mało czuły w przypadku obniżonej odporności typu komórkowego. Test tuberkulinowy jest mało swoisty, ponieważ PPD to mieszanina wielu białek, których determinanty antygenowe obecne są w większości gatunków prątków włącznie z BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). U osób szczepionych BCG oraz zakażonych prątkami środowiskowymi wynik testu tuberkulinowego może być dodatni [6–12].

### **Testy IGRA (*interferon γ release assays*) w diagnostyce gruźlicy**

W ciągu ostatnich kilku lat pojawiły się nowe możliwości rozpoznania utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy. Powstały testy: QuantiFERON-TbGold (Cellestis, Carnegie, Australia) [4] oraz T-SPOT.TB (Oxford Immunotec, Abingdon, Wielka Brytania), które są wysoce specyficzne i czułe w wykrywaniu zakażenia prątkiem gruźlicy [4]. Zasada ich działania opiera się na pomiarze IFN- $\gamma$ , wydzielanego przez swoiste limfocyty T stymulowane przez antygeny specyficzne dla *M. tuberculosis* i nielicznych innych gatunków prątków (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. microti*), co podnosi wartość diagnostyczną testów. Brak

ich natomiast u bakterii szczepu BCG. Są to: ESAT-6 (*early secretory antigen target 6*) oraz CFP-10 (*culture filtrate protein 10*), a w nowszej wersji testu QuantiFERON-TbGold tzw. QuantiFERON-GIT (*in tube*) w zestawie antygenów jest jeszcze Tb 7,7 (swoisty antygen dla prątków gruźlicy) [9–24].

Antygeny ESAT-6 oraz CFP-10 kodowane są przez tzw. *Region of Difference 1* (RD1). Jest to fragment genomu prątka, który, jak wykazały wyniki badań prowadzonych od lat 90. XX wieku, występuje w *M. tuberculosis* (nie ma go natomiast w genomie prątków BCG oraz większości prątków środowiskowych, z wyjątkiem wspomnianych *M. kansasii*, *M. szulgai* i *M. microti*).

Fragment RD1 koduje tzw. ESX1 system (geny *Rv3870-Rv3879*, ESAT-6 oraz CFP-10). Antygeny ESAT-6 i CFP-10 odpowiedzialne są za zjadliwość *M. tuberculosis* (są dowody na to, że komplementacja szczepów BCG przez RD1 powoduje wzrost ich zjadliwości oraz namnażanie się w płucach, podobnie delekcje RD1 ze zjadliwych szczepów *M. tuberculosis* H37Rv skutkują utratą zdolności wewnątrzkomórkowego wzrostu prątków w makrofagach) [14, 15, 25].

Zasada działania testu QuantiFERON oparta jest na metodzie ELISA [6, 7], jej kolejne etapy to:

- inkubacja krwi pobranej od osoby badanej przez 24 godziny (u osób zakażonych prątkiem gruźlicy dochodzi do zwiększonej produkcji IFN- $\gamma$  przez uczulone antygenami prątka limfocyty T krwi obwodowej);
- IFN- $\gamma$  z osocza jest wychwytywany przez specyficzne dla niego przeciwciała;
- przeciwciała te łączą się następnie z innymi przeciwciałami skoniugowanymi z enzymem katalizującym reakcję kolorymetryczną;
- po pomiarze gęstości optycznej stężenie IFN- $\gamma$  określa się przy użyciu krzywej standardowej. Przyjmuje się stężenie IFN- $\gamma \geq 0,35$  j.m./ml za dodatni wynik testu [14].

Etapy testu ELISpot (*Enzyme-Linked ImmunoSpot Assay*) [6, 7]:

- inkubacja komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w obecności antygenów ESAT-6 i CFP-10 przez 16–24 godzin;
- u osób zakażonych prątkiem dochodzi do produkcji IFN- $\gamma$  przez uczulone limfocyty T osoby badanej;
- połączenie IFN- $\gamma$  w sąsiedztwie limfocytów T ze specyficznymi dla niego przeciwciałami, a następnie połączenie przeciwciał specyficznych dla IFN- $\gamma$  z innymi przeciwciałami skoniugowanymi z enzymem, który katalizuje kolorymetryczną reakcję, dając obraz „plam”;
- każda plama reprezentuje ślad komórki T, która odpowiedziała na antygeny produkcją IFN- $\gamma$ ;

— za wynik dodatni badania przyjmuje się liczbę plam wynoszącą co najmniej 6 [14].

W omawianych testach, jednocześnie z badaniem stopnia stymulacji swoistej, w odpowiednich kontrolach mierzy się „kondycję” limfocytów. Są to zazwyczaj pomiary spontanicznej oraz stymulowanej mitogenezą sekrecji IFN- $\gamma$  przez limfocyty T.

### Rekomendacje dla testów IGRA

W grudniu 2005 roku *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) oraz *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) zarekomendowały stosowanie testu QuantiFERON we wszystkich okolicznościach, w których jest stosowany TST, włączając w to badania osób będących w styczności z osobą prątkującą, imigrantów oraz seryjne badania pracowników służby zdrowia. Zalecenia te określają wyraźnie, że test ten może być stosowany w zastępstwie, a nie w uzupełnieniu TST, a używa się go powszechnie (jak również jego nową wersję, tzw. QuantiFERONTb Gold IT, która zawiera trzeci specyficzny dla *M. tuberculosis* antygen TB 7.7) w Stanach Zjednoczonych oraz w Europie (tu również szeroko stosowany T-SPOT.TB). Obydwa testy są zalecane przez wytyczne *U.K. National Institute for Health and Clinical Excellence* (NICE) opublikowane w lutym 2006 roku. Zalecenia NICE rekomendują w diagnostyce utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy strategię hybrydową, tzn. początkowe badanie przesiewowe przez zastosowanie TST, a w przypadku otrzymania pozytywnego wyniku zastosowanie testu IGRA (*interferon gamma release assays*) dla potwierdzenia dodatniego wyniku TST [9, 10, 15, 21].

### Czułość i swoistość testów IGRA

Obydwa testy odznaczają się wysoką swoistością: 62–100% [4], znacząco wyższą niż TST, co jest uwarunkowane brakiem wpływu na nie szczepień BCG i zakażeń prątkami środowiskowymi. Testy te mają również wysoką czułość. Wykazano, że czułość ELISpot wahała się w granicach 83–97% i była wyższa niż czułość osiągnięta metodą ELISA (70–89%) [4]. Różnice w czułości obydwu testów można tłumaczyć tym, że ELISpot określa liczbę limfocytów produkujących interferon po swoistym pobudzeniu, a test ELISA mierzy stężenie IFN- $\gamma$  po wydzieleniu do medium. Wyniki nowych badań wykazują jednak, że optymalne wartości punktów odcięcia dla obydwu testów mogą się różnić od rekomendowanych [14]. Obecnie pojawiają się również badania wykazujące inne punkty odcięcia dla utajonego zakażenia gruźlicą i czynnej postaci gruźlicy [9].

Udowodnienie wyższej wartości diagnostycznej nowych testów w porównaniu z testem tuberkulinowym w przypadku utajonego zakażenia prątkiem gruźlicy jest trudniejsze niż w przypadku czynnej postaci choroby, ponieważ nie ma metody referencyjnej dla rozpoznania LTBI. Niestety, nie jest możliwe dokładne oznaczenie czułości i swoistości w tym przypadku. Prawdopodobieństwo zakażenia prątkiem rośnie wraz ze wzrostem długości wspólnie spędzonego czasu i bliskością kontaktu z osobą chorą; kluczowym wyznacznikiem zakażenia będzie liczba wspólnie spędzonych godzin. Tak więc, jeśli nowe testy są w istocie bardziej czułe i swoiste niż TST, powinny lepiej korelować z poziomem ekspozycji i być niezależne od szczepień BCG [6].

Prowadzono ostatnio badania przy użyciu testu ELISpot, które objęły 1136 kontaktów chorych na gruźlicę. Dowiodły one wysokiej swoistości testu, wykazując brak wpływu szczepień BCG na wynik tego testu w przeciwieństwie do testów tuberkulinowych przeprowadzonych równocześnie u tych osób. Test ELISpot korelował również lepiej z ekspozycją na gruźlicę niż test skórny, sugerując wyższą czułość niż TST [6].

Na podstawie badania oceniającego test ELISA wykazano, że był również niezależny od przeprowadzonych w przeszłości szczepień BCG, a jego korelacja z ekspozycją na gruźlicę była zbliżona do TST [6].

### Rozbieżność wyników między testami IGRA a TST

Zgodność wyników między TST a testami IGRA oceniana jest na około 60–90% w większości badań [4, 26]. Niezgodność TST dodatni/IGRA ujemne prawdopodobnie zależy od wcześniejszych szczepień BCG, a także immunizacji niegruźliczymi prątkami środowiskowymi. Istnieje jednak prawdopodobieństwo mniejszej czułości testów IGRA w pewnych sytuacjach klinicznych, jak również możliwość, że IGRA wykrywają tylko pewien etap odpowiedzi immunologicznej w zakażeniu prątkami, na przykład świeżą infekcję, która szybko ulega spontanicznej regresji lub mija pod wpływem leczenia [4]. Być może za niezgodność TST dodatni/IGRA ujemne odpowiedzialny jest za krótki czas inkubacji z antygenami. O tej hipotezie mogą świadczyć wyniki badań, w których przedłużano czas inkubacji w teście QuantiFERON do kilku dni i początkowo ujemny test stawał się dodatni [27].

Niezgodność drugiego typu, czyli TST ujemne, ale IGRA dodatnie, jest bardziej niezrozumiała. Może należałoby zmienić stosowane do tej pory

punkty odcięcia w celu zwiększenia czułości testów IGRA? Jest również prawdopodobne, że IGRA wykrywają, jak już wspomniano, świeże zakażenie prątkiem, za które odpowiedzialne są limfocyty T efektorowe (TST jest jeszcze ujemny, gdyż limfocyty T pamięci biorące udział w tej reakcji nie zostały jeszcze pobudzone i nie odpowiadają wyrzutem IFN- $\gamma$ ) [3, 6, 17, 26, 27]. Ponadto należy wziąć pod uwagę, że w krajach o wysokiej zapadalności na gruźlicę istnieje wiele czynników modulujących immunologiczną równowagę Th1/Th2, na przykład niedożywienie, mykobakteriozy środowiskowe, trąd, robaczyce czy infekcje tropikalne [6].

### Testy IGRA w grupach ryzyka zakażenia prątkiem gruźlicy

Dotychczas ukazało się niewiele prac poświęconych zastosowaniu IGRA w takich grupach ryzyka, jak: zakażenie HIV, cukrzyca, niewydolność nerek, leczenie immunosupresyjne, przeszczepianie narządów, a także u dzieci i osób starszych. W grupach tych TST jest zwykle mniej czuły ze względu na anergię. Ujemne wyniki testów skórnych uniemożliwiają właściwą kwalifikację do zastosowania chemioprophylaktyki. Testy IGRA w tych populacjach wykazują większą czułość niż TST, aczkolwiek z drugiej strony cechują się znaczną liczbą wyników tzw. *indeterminate*, czyli nieokreślonych, spowodowanych utratą zdolności odpowiedzi na mitogen (w tych przypadkach wskazane jest wykonanie dodatkowego testu z mitogenem), co wynika z nieprawidłowej liczby lub funkcji limfocytów CD4 [11, 12, 17].

Obiecujące jest zastosowanie testów IGRA w seryjnych badaniach pracowników służby zdrowia. Oceniają one obecność zakażenia prątkiem w tej populacji, a ich powtarzanie może wykryć „konwersję”, czyli świeże zakażenie. Potrzeba jednakże wielu dalszych badań w celu ustalenia wartości progowych dla konwersji testów IGRA [28–30].

### Testy IGRA w gruźlicy niepotwierdzonej bakteriologicznie

Wynik badania Jafari i wsp. [31] wykonanego u dorosłych z podejrzeniem gruźlicy, które nie udało się potwierdzić bakteriologicznie, wykazał, że celowe u takich chorych jest wykonanie bronchoskopii z płukaniem oskrzelowo-pęcherzykowym (BAL, *bronchoalveolar lavage*) oraz testu ELISpot. Grupa kontrolna miała znacznie mniej limfocytów T pobudzonych przez specyficzne antygeny ESAT-6 oraz CFP-10 w pły-

nie oskrzelowo-pęcherzykowym niż chorzy na gruźlicę. Test ten może być ważnym narzędziem diagnostycznym w gruźlicy niepotwierdzonej bakteriologicznie.

### Testy IGRA po leczeniu gruźlicy

Wyniki testów IGRA po leczeniu gruźlicy są jednoznaczne. Część badaczy wykazuje, że pozostają niezmienione [32], w części badań stwierdzono, że zmieniają się po leczeniu w zakresie odpowiedzi na niektóre tylko antygeny (np. CFP-10) [33].

### Wartość prognostyczna testów IGRA

Kluczowym pytaniem pozostaje możliwość identyfikacji przez testy IGRA osób z dodatnim wynikiem testów, które zachorują na gruźlicę, czyli tych, którzy mogliby odnieść korzyść z chemioprophylaktyki. Byłoby to szczególnie ważne w diagnostyce dzieci, osób zakażonych HIV czy u chorych w stanach immunosupresji. Diel i wsp. [34] podali w lutym 2008 roku wyniki dwuletniej obserwacji dwóch grup osób pozostających w bliskich kontaktach z chorymi na gruźlicę (tzw. bliskich kontaktów), czyli grupy z dodatnim wynikiem TST oraz grupy z dodatnim wynikiem testu QuantiFERON. W grupie z dodatnim wynikiem TST odnotowano jedynie 2,3% zachorowań na gruźlicę (5/219) w trakcie obserwacji, z kolei w grupie drugiej — 14,6% (6/41). Wartość prognostyczna testów IGRA byłaby więc znacznie wyższa niż TST. Istnieje potrzeba kontynuacji tych badań z udziałem większej liczby badanych oraz stworzenia pomocnych modeli matematycznych [35].

### Podsumowanie

Testy IGRA są nieco bardziej czułe niż TST, aczkolwiek na wyniki obydwu wpływa stan immunosupresji; IGRA są prawie w 100% swoiste (w przeciwieństwie do TST, na które mają wpływ szczepienia BCG oraz zakażenia prątkami środowiskowymi [wyjątek: *M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. microti*, w przypadku których IGRA mogą być dodatnie]). Stwierdzono silną korelację między ekspozycją na gruźlicę a dodatnim wynikiem testu IGRA, co ma niewątpliwą zaletę w dochodzeniach epidemiologicznych (jak również brak zjawiska *booster*). Istotną cechą testów IGRA jest możliwość tylko jednej wizyty pacjenta oraz to, że wynik można uzyskać już w ciągu 1–2 dni. Niestety, wykonanie ich wymaga odpowiedniej infrastruktury laboratoryjnej i kwalifikacji personelu.



Niedefiniowana dotychczas w testach IGRA (a możliwa przy zastosowaniu TST) jest ocena zjawiska konwersji i rewersji, co będzie wymagało dalszych badań. Niezbędne jest również określenie nowych punktów odcięcia dla dodatnich wartości testów dla różnych populacji [36].

Dotychczasowe obserwacje pozwalają jednak przypuszczać, że testy IGRA zastąpią stosowane dotychczas testy skórne nie tylko ze względu na wysoką czułość i większą swoistość, lecz także z powodów finansowych. W pracy Diela i wsp. [37] porównano koszt chemioprophylaktyki stosowanej u osób z grupy bliskich kontaktów na podstawie TST i testów IGRA na korzyść tych drugich.

Być może znaczące korzyści finansowe płynące ze stosowania testów IGRA w strategii opanowania gruźlicy będą przesłanką do ciągłego ich ulepszania i sukcesywnego włączania do diagnostyki w coraz liczniejszych krajach [37, 38].

## Piśmiennictwo

- Global Tuberculosis Control-surveillance, planning, financing 2006: WHO report 2006, Geneva, World Health Organization (WHO/HTM/TB/2006.362).
- Bates J.H., Huitt G.A. Gruźlica i zakażenia prątkami atypowymi. W: Atlas chorób płuc. Gdańsk, Via Medica 2007: 119–132.
- Kang A.W., Lee W.H., Yoon H.I. i wsp. Discrepancy between the tuberculin skin test and the whole-blood interferon-gamma assay infection in an intermediate tuberculosis-burden country. JAMA 2005; 293: 2756–2761.
- Pai M., Kalantri S., Dheda K. New tools and emerging technologies for the diagnosis of tuberculosis. Part I. Latent tuberculosis. Expert Rev. Mol. Diagn. 2006; 6: 413–422.
- Richeldi L. An update on the diagnosis of tuberculosis infection. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006; 174: 736–742.
- Lalvani A. Diagnosing Tuberculosis Infection in the 21<sup>st</sup> Century. New tools to tackle an old enemy. Chest 2007; 131: 1898–1906.
- Pai M., Riley L.W., Colford J.M. Jr i wsp. Interferon- $\gamma$  assays in the immunodiagnosis of tuberculosis: a systemic review. Lancet Infect. Dis. 2004; 4: 761–776.
- Diel R., Ernst M., Doscher G. i wsp. Avoiding the effect of BCG vaccination in detecting *Mycobacterium tuberculosis* infection with a blood test. Eur. Respir. J. 2006; 28: 16–23.
- Janssens J.P., Roux-Lombard J., Perneger T. i wsp. Quantitative scoring of an interferon gamma assay for differentiating active from latent tuberculosis. Eur. Respir. J. 2007; 30: 722–727.
- Pai M., Joshi R., Dogra S. i wsp. Persistently elevated T cell interferon gamma responses after treatment for latent tuberculosis infection among health care workers in India: a preliminary report. J. Occup. Med. Toxicol. 2006; 1: 7.
- Brock I., Ruhwald M., Lundgren B. i wsp. Latent tuberculosis in HIV positive, diagnosed by the *M. tuberculosis* specific interferon gamma test. Respir. Res. 2006; 7: 56.
- Kobashi Y., Mouri K., Obase Y. i wsp. Clinical evaluation of QuantiFERON TB-2G test for immunocompromised patients. Eur. Respir. J. 2007; 30: 945–950.
- Diel R., Nienhaus A., Lange C. i wsp. Tuberculosis contact investigation with a new, specific blood test in a low-incidence population. Respir. Res. 2006; 7: 77.
- Anderson S.T., Williams A.J., Brown J.R. i wsp. Transmission of *Mycobacterium tuberculosis* undetected by tuberculin skin testing. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006; 173: 1038–1042.
- Arend M.S., Thijsen F.S., Leyten S.M. Comparison of two interferon-gamma assays and tuberculin skin test for tracing tuberculosis contacts. Am. J. Crit. Care Med. 2007; 175: 618–627.
- Cohn L.D. The effect of BCG vaccination on tuberculin skin testing. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 164: 915–916.
- Pai M., Menzies D. The new IGRA and the old TST. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007; 175: 529–530.
- Young K.A., Hye L., Seung H.S. Usefulness of whole-blood interferon-gamma assay and interferon-gamma enzyme-linked immunospot assay in the diagnosis of active tuberculosis. Chest 2007; 132: 959–965.
- Lalvani A., Pathan A.A., McShane H. i wsp. Rapid detection of active *Mycobacterium tuberculosis* infection by enumeration of antigen-specific T cells. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2001; 163: 824–828.
- van Leeuwen R.M., Bossink A.W.J., Thijsen S.F.T. Exclusion of active *Mycobacterium tuberculosis* complex infection with the T-SPOT.TB assay. Eur. Respir. J. 2007; 29: 605–607.
- Ferrara G., Losi M., Meacci M. i wsp. Routine hospital use of a new commercial whole blood interferon-gamma assay for the diagnosis of tuberculosis infection. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2005; 172: 631–635.
- Pai M., Lewinsohn D.M. Interferon- $\gamma$  assays for tuberculosis. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2005; 172: 519–520.
- Ravn P., Munk M.E., Andersen A.B. Prospective evaluation of a whole-blood test using *Mycobacterium tuberculosis* — specific antigens ESAT-6 and CFP-10 for diagnosis of active tuberculosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 2005; 12: 491–496.
- Sood A., Schuyler M. Finally, a perfect diagnostic test for pulmonary tuberculosis — or is it? Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006; 174: 963–964.
- Ernst D.J., Trevejo-Nunez G., Banaiee N. Genomics and evolution, pathogenesis, and diagnosis of tuberculosis. J. Clin. Inv. 2007; 117: 1738–1745.
- Pai M., Kalantri S., Menzies D. Correspondence. Disordance between tuberculin skin test and interferon-gamma assays. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2006; 10: 942–944.
- Cehovin A., Cliff M.J., Hill C.P. i wsp. Extended culture enhances sensitivity of a gamma interferon assay for latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. Clin. Vaccine Immunol. 2007; 14: 796–798.
- Drobniewski F., Balabanova Y., Zakamova E. i wsp. Rates of latent tuberculosis in health care staff in Russia. PLoS Med. 2007; 4: 1–7.
- Pai M., Joshi R., Dogra S. Serial testing of health care workers for tuberculosis using interferon- $\gamma$  assay. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2006; 174: 349–355.
- Demkow U., Filewska M., Łuczak K. i wsp. Ocena częstości występowania zakażenia prątkiem gruźlicy u pracowników służby zdrowia na podstawie testu uwalniania interferonu gamma. Pneumonol. Alergol. 2006; 74: 285.
- Jafari C., Ernst M., Kalsdorf B. Rapid diagnosis of smear-negative tuberculosis by bronchoalveolar lavage enzyme-linked immunospot. Am. J. Crit. Care Med. 2006; 174: 1048–1054.
- Pai M., Rajnish J., Sandeep D. i wsp. Tuberculosis infection among health care workers in India: a preliminary report. J. Occup. Med. Toxicol. 2006; 1: 7.
- Chee B.E., Cynthia, KhinMar W.K., Gan H.S. i wsp. Latent tuberculosis infection treatment and T-cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*-specific antigens. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2007; 175: 282–287.
- Diel R., Loddenkemper R., Meywald-Walter K. i wsp. Predictive value of a whole blood IFN- $\gamma$  assay for the development of active tuberculosis disease after recent infection with *Mycobacterium tuberculosis*. Am. J. Respir. Crit. Care Med. 2008; 177: 1164–1170.
- Pai M., Dheda K., Cunningham J. i wsp. T-cell assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: moving the research agenda forward. Lancet Infect. Dis. 2007; 7: 428–438.
- van Leeuwen R.M., Bossink A.W.J., Thijsen S.F.T. Interferon- $\gamma$  release assay tests to rule out active tuberculosis. Eur. Respir. J. 2007; 30: 183–185.
- Diel R., Wrighton-Smith P., Zellweger J-P. Cost-effectiveness of interferon-gamma release assay testing for the treatment of latent tuberculosis. Eur. Respir. J. 2007; 30: 321–332.
- Oxlade O., Schwartzman K., Menzies D. Interferon-gamma release assays and TB screening in high-income countries: a cost-effectiveness analysis. Int. J. Tuberc. Lung Dis. 2007; 11: 16–26.